

Deskriptivna i funkcionalna definicija jezgrice – put prema terapiji raka

Descriptive and functional definition of nucleolus – a pathway to cancer therapy

Mira Krstulja^{1*}, Gordana Đorđević¹, Irena Seili-Bekafigo², Tamara Braut³

Sažetak. Očekuje se da moderna terapija tumora djeluje ciljano i sveobuhvatno. U novim kliničkim ispitivanjima terapije raka primjenjuju se mali molekularni inhibitori transkripcije ribosomalnih gena i aktivatori apoptoze. Model terapije prikazan ovdje je aktivacija supresora tumora koji djeluju u domeni jezgrice. Stanice tumora pokazuju poremećaj regulacije proteina i mutaciju P53 gena koji suprimira rast. Razvoj bolesti definira terapiju. Moderna se definicija bolesti temelji na etiopatogenezi staničnog stresa u kojem sudjeluju brojne organele, uključujući jezgricu. Jezgra i jezgrica su mikroskopski oblici. Ovaj prikaz daje sažet opis onoga što se vidi kada se kaže „jezgrica“. Nadalje su opisani kiseli nehistonski proteini koji se okupljaju oko transkripcijskog ustroja RNK polimeraze I te je istaknut značaj njihove vizualizacije za promjenu definicije jezgrice. Osim što je tjelešce u nukleoplazmi i subnuklearna organela, jezgrica se može vizualizirati pomoću njezinih funkcionalnih struktura – AgNOR-a. AgNOR proteini imaju ulogu u nukleolarnom stresu. Svrha ovoga teksta je raspraviti nukleolarni stres.

Ključne riječi: biološki stres; bolest; karcinogeneza; stanična jezgrica; terapija

Abstract. Modern tumour therapy should be target specific and comprehensive. Recent clinical trials test small molecular inhibitors of transcription of ribosomal genes and activators of apoptosis. We treatise on models of activation of the suppressors of tumour growth acting in the nucleolar domain. Tumour cells demonstrate a disordered protein regulation and mutation of P53 gene which codes for a suppressor of growth. Therapy is guided by pathogenesis. Modern disease definition is based on etiopathogenesis of cell stress, wherein participate numerous organelles, including the nucleolus. Nucleus and nucleolus are forms seen on light microscopy. This presentation focuses on the description of the visible correlate of the notion of “nucleolus”. Further to this, acid non-histone proteins which gather around the transcriptional machinery of RNA polymerase I are described, and the significance of their visualisation towards the alteration of the definition of nucleolus is pointed out. Besides being a particle within the nucleoplasm and a subnuclear organelle, the nucleolus is visualized through its functional structures – the AgNORs. The AgNOR proteins have a role in nucleolar stress. The aim of this article is to discuss the nucleolar stress.

Key words: biological stress; carcinogenesis; cell nucleolus; disease; therapeutics

¹Zavod za patologiju i patološku anatomiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

²Zavod za kliničku citologiju, KBC Rijeka, Rijeka

³Klinika za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, KBC Rijeka, Rijeka

*Dopisni autor:

Izv. prof. dr. sc. Mira Krstulja, dr. med.
Zavod za patologiju i patološku anatomiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka
e-mail: mira.krstulja@medri.uniri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

U JEZGRICI

U proučavanju jezgrice 2015. godina označila je pedesetogodišnjicu značajnog zbivanja¹ za medicinsku znanost i praksu. Na Simpoziju o strukturi i funkciji jezgrice u Montevideu 1965. godine (u daljem tekstu „Simpozij 1965.”) izvršen je, za to doba, sveobuhvatni prikaz jezgrice, gdje je po prvi put definirano da nukleolarni organizatori (NOR-i)^{2,3}, oko kojih se oblikuje interfazna jezgrica, sadrže gensku informaciju za sintezu rRNK-a

Definirana kao mjesto biogeneze ribosoma, jezgrica je usmjerila pažnju znanstvenika na ribosome. Pokazalo se da količina AgNOR proteina u jezgri ovisi o jačini transkripcije ribosomalnih gena. Intenzivno ispitivanje AgNOR-a u patologiji prethodilo je opisu jezgrice kao otvorenog molekularnog sustava i multifunkcionalne organele. Deskriptivna definicija jezgrice postavila je pitanje funkcije nekonvencionalnih proteina u jezgri.

(ribosomalna ribonukleinska kiselina)⁴. Ranije opisane razlike u građi i obliku jezgrice kod različitih bioloških vrsta u različitim stadijima razvoja^{5,6} i u bolesti⁷ te shvaćanje segregacije kao prolaznog stanja inaktivacije jezgrice kod oštećenja transkripcije ribosomalnih gena, tj. rDNK (ribosomalna deoksiribonukleinska kiselina; engl. *ribosomal DNA*; rDNA)⁸⁻¹⁰, postale su nedostatne za raspravu o funkciji. Kako se jezgrica već početkom dvadesetog stoljeća i danas opisuje kao citogenetsko svojstvo eukariotske stanice, uz nju su vezana imena poznatih citogenetičara poput Emila Heitza², Barbare McClintock³ i Anastassove-Kristeve¹¹. Citogenetski pristup jezgri u patologiji podržale su škole Plotona^{12,13}, Derenzina^{14,15} i Hernandez-Vendun¹⁶. Istraživanja strukture i funkcije jezgrice su brojna, a literatura opsežna. Među najčešćim pitanjima koja su dulje vremena okupirala pažnju znanstvenika bila su: kako definirati jezgricu kao organelu bez membrane, gdje se točno odvija transkripcija ribosomalnih gena – u fibrilarnim centrima (FC) ili u gustoj fibrilarnoj komponenti (engl. *dense fibrillar component*; DFC) te kako povezati dinamiku promjene oblika s funkcijom. Autori koji su svoj rad posvetili jezgri zaslužni su za brojne revijalne prikaze koji se re-

dovno javljaju svake godine, no odgovor na gore navedena pitanja pripada svima. Nakon što je na Simpoziju 1965. ukazano na mjesto sinteze rRNK-a u jezgri, još daljnjih trideset godina jezgrica je definirana biosintezom ribosoma kao jedinom funkcijom. Usmjeravanjem pozornosti znanstvenika na ribosome postignut je značajan uspjeh u proučavanju jezgrice i njezine uloge u nastanku bolesti. Danas se zna da jezgrica nije samo organela koja proizvodi ribosome. Prisutnost u jezgri proteina koji nisu direktno u funkciji biogeneze ribosoma pokrenula je raspravu o funkciji jezgrice. Biti u organeli koja nema membranu znači, osim u biogenezi ribosoma, sudjelovati u dinamičkim promjenama staničnog ciklusa, diferencijacije, starenja te u nukleolarnom stresu koji je definiran poremećajem navedenih procesa. Tema ovog napisa je nukleolarni stres¹⁷ sa stajališta patologa.

ORGANIZACIJA JEZGRICE I JEZGRINA TJELEŠĆA

Biogeneza ribosoma pripada tom jednom i ne drugom organizmu, a ovisi o diferencijacijskom tipu stanice i fazi rasta. Stoga je regulacija ribosomalne biogeneze vrlo kompleksna. Ovom napomenom želi se podsjetiti na nuklearni transfer¹⁸, hibridne jezgre¹⁹, pojavu dominacije jezgrice²⁰ i epigenetske promjene u njoj²¹, što je uglavnom izvan okvira ovog teksta koji je namijenjen međudodnosu strukture i funkcije jezgrice u jezgri. Jezgra i jezgrica su mikroskopski oblici. Jezgra je subcelularna, a jezgrica subnuklearna organela^{10,22-24}. U staničnoj jezgri jezgrica se opaža kao područje koje jače lomi svjetlost²⁵ i u kojem se nalaze višestruke kopije gena za rRNK.^{3,4,26} U hematoksilin-eozinskom preparatu jezgrica je najkrupnija plavo obojena gruda kromatina (točkasta struktura, engl. *blue dot*). Kao subnuklearna organela ona prisutnošću oblika izražava prisutnost organizirane funkcije. Zahvaljujući vrlo uočljivom obliku u interfazi, jezgrica je prva ukazala da postoji organizacija jezgre koja nije slučajna (engl. *non random*). Nukleolarni organizatori metafazni su rezidualni oblik organizacije jezgre u području rDNK-a^{27,28}. S malim modifikacijama srebrni nitrat prikazuje nukleolarne organizatore u metafazi i interfazi staničnog ciklusa^{12,29,30}. Kod čovjeka se NOR-i nalaze na akrocentričnim kromosomima 13, 14, 15, 21 i 22⁶ koji, time što su na okupu²¹,

definiraju položaj interfazne jezgrice u jezgri. U tome se ribosomalni geni, njihovi nositelji, i jezgra ponašaju kao ostali geni: centralni položaj u jezgri ukazuje na aktivnu funkciju dok periferni položaj uz jezgrinu membranu ukazuje na smanjenje funkcije gena. Mikroskopski je jednostavan primjer za međudnos položaja i funkcije promjena položaja jezgrice epitela endometrija prema fazi hormonskog ciklusa: snažnu proliferaciju (snažnu transkripciju rDNK-a) prati položaj jezgrice centralno u jezgri. Ulaz u fazu sekrecije prati pad proliferacije (smanjenje transkripcije rDNK-a) i pomak jezgrice periferno³¹, što ima određeni dijagnostički značaj u kontroli faze hormonalnog ciklusa. No ono glavno na što ukazuju kretanja jezgrice u jezgri je položaj koji nije nasumičan (centralno-periferno), a time ni funkcije nisu nasumične.

Jezgrica je tjelešce organizirano u interfazi oko nukleolarnih organizatora naslijeđenih iz metafaze^{29,30}. Ako u jezgri postoji više takvih tjelešaca, ona pretežno konfluiraju u jedno tijelo – jedinstvenu jezgricu¹¹. Osobina tijela je da promjenom položaja ne mijenja funkciju, kao što je prethodno opisano, centralni ili periferni položaj jezgrice u stanici endometrija govori o promjeni intenziteta funkcije, ali ne o promjeni same funkcije. Jezgrica je, stoga, „organčić” koji se može prenijeti. Strukturalna i funkcionalna plastičnost jezgrice (očuvanje građe i funkcije usprkos dinamičkim promjenama) ovisi o pravilnoj funkciji gena za nuklearne lamine. Dinamičnost strukture čini jezgricu senzorom promjena u metabolizmu.

Biološka su tjelešca dinamične strukture kojima je glavna osobina integritet, što je više od fizičke cjelovitosti. Interfazna nuklearna tjelešca pojavljuju se u velikom broju te nastaju i mijenjaju se kao posljedica prostornog razdvajanja staničnih funkcija i kretanja molekula – šaperona (što je proces kompartmentalizacije jezgre)³². Osim jezgrice u jezgri su tjelešca promijelocitne leukemije (PML), Cajalova tjelešca (engl. *Cajal body*; CB), manji točkasti i pjegasti molekularni kompleksi (engl. *gem* i *speckle*), tjelešca nuklearnog stresa (engl. *nuclear stress bodies*; NSB), tjelešca histonskog lokusa (engl. *histone locus bodies*; HLB), perinukleolarni i ekstranukleolarni odjeljak^{33,34}. U interfazi se nuklearna tjelešca prostorno preklapaju kada postoji funkcionalna interakcija. Prekla-

panje se zapaža po tome što koilin, koji je tipičan CB protein, kolokalizira s proteinima jezgrice, a fibrilarin, tipični protein jezgrice, kolokalizira u Cajalovim tjelešcima kao izraz kofunkcije. Kolokalizacija i kofunkcija jezgrinih tjelešaca, odnosno njihovih tipičnih molekula, ne podrazumijevaju nužno sinkronizaciju. Potencijalno prisutna funkcija ne mora biti aktivna. Kolokalizacija može imati negativne implikacije, tj. u brojnim situacijama sekvenciranja proteina u jezgri kolokalizacija molekula ukazuje na inhibiciju funkcije.

Bitno u interpretaciji kretanja u jezgri je što već klasično mikroskopsko promatranje preklapanja funkcionalnih prostora jezgrice ukazuje da nema rigidne membrane i da molekule koje definiraju prostor jezgrinih organela kolokaliziraju funkcionalno uvjetovanim kretanjem¹⁶. Moderne metode analize kretanja jezgrice i njenih proteina uključuju zakone fizike i ističu da su sva jezgrina tjelešca membranom neomeđena, viskozna, tekućini nalik struktura³⁵. Ova spoznaja bit će snažan poticaj za razvoj metoda koje omogućuju promatranje molekularnih kretanja. Danas se o aktivnosti funkcije molekula i bioloških oblika zaključuje metodama poput mikroskopije u živo (engl. *live microscopy*), obilježavanjem molekula fluorescentnim markerom (npr. GFP; engl. *green fluorescent protein*) i metodom FRAP (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*), koje prikazuju kretanje molekula³⁶. Ovih nekoliko redaka ukazuju, osim na multiparametarski pristup u istraživanju strukture i funkcije jezgrice^{37,38} i na interakciju (biotehnologije, biologije, fizike, kemije, fiziologije i morfologije s jedne strane te kliničkih struka s druge strane) u pristupu jezgri u zdravlju i bolesti. Takva interakcija znanstvenih i stručnih disciplina čini jezgricu značajnim faktorom u translacijskoj medicini koja znanje o proteinima jezgrice (nukleolomika) primjenjuje u praksi koja je s druge strane poticaj u proučavanja jezgrice (engl. „*bench to bedside*” i obratno). U tome se ističu dva pravca: jezgrica u somatskoj stanici i jezgrica u zametnoj stanici (odnosno u interfazi i mitoz/mejozi).

Za razliku od interfaze, kada se jezgrina tjelešca kreću integrativno, jezgricu u mitozu karakterizira redistribucija proteina te se slična diskusija, poput one o kretanju jezgrinih tjelešaca, može provesti o odnosu položaja i funkcije proteina

jezgrice u vrijeme mitoze, pri čemu promjena položaja proteina rezultira promjenom subnuklearnih i subnukleolarnih oblika³⁹⁻⁴². Sve manje se govori da u mitozu jezgrica nestaje¹¹. Ako nukleolin (C23), glavni protein jezgrice, u vrijeme mitoze oblaže kromosome i nalazi se u NDF-u (engl. *nucleolus derived focus*), onda nevizualizirani oblik interfazne jezgrice ne znači da nema molekularnog sustava, već znači da postoji promjena procesa koji sada vizualiziraju kromosom i jezgricu preklapanjem u položaju njihovih molekula. Kada u interfazi na molekularnoj razini međusobno surađuju jezgrica i telomere³⁹, to je interakcija intrakromozomalnih funkcionalnih domena.

Nekoliko tjelešaca tijekom mitoze i ranog embrionalnog razvoja mikroskopski imitira interfazni oblik jezgrice. NDF (engl. *nucleolus derived foci*) u vrijeme segregacije kromosoma čuvaju pre-rRNK različite elongacije⁴⁰, a karakterizira ih kolokalizacija B23 i rRNK-a. PNB (engl. *prenucleolar body*) telofazni je oblik u kojem završava sazrijevanje rRNK-a koje je započelo prije mitoze⁴¹ i sadrži preribosome, ali ne i rDNK. AgNOR-i su odsutni u embrionalnim prekursorima jezgrice NPB-a (engl. *nucleolus precursor bodies*) koji su centri oblikovanja jezgrice u prvim diobama nakon oplodnje⁵. Mitotička i interfazna tjelešca jezgre definirana su razlikom u sastavu molekularnih kompleksa, što ukazuje na razlike u intenzitetu funkcije i na multifunkcionalnost proteina. Što je još značajnije, opisana stanična tjelešca ukazuju na prijenos molekularne i formalne ekspresije funkcija iz prethodnog ciklusa kroz kaskade mitoze u sljedeći ciklus, što je način prijenosa informacije u samoodnavljanju, to jest proliferaciji. U interfazi izostanak funkcije neke od molekula transkripcijskog ustroja RNK polimeraze I, funkcionalnog molekularnog kompleksa jezgrice, označava nedostatak funkcije jezgrice u smislu transkripcije rDNK-a i ribosomalne biogeneze^{42,43}. Na tome se baziraju neki modeli moderne terapije raka koja blokira transkripciju rDNK-a.

Danas gotovo svako istraživanje započinje definicijom jezgrice kao multifunkcionalne strukture s primarnom funkcijom sinteze ribosoma. Potrebno je razlikovati strukturu i oblik. Prihvaćeno je da se oblik jezgrice ne mora nužno održati da bi se zadržala funkcija⁴⁴. Prisutnost oblikovanja upozorava da postoji organizacija i, iako ne govori ka-

kva je to organizacija, pokreće analizu sastavnica. Oblik jezgrice kao organele ovisi o kompleksnom supramolekularnom udruživanju za vrijeme prijenosa informacije od rDNK-a do ribosoma^{44,45}. Promjenom oblika jezgrice organizacija molekula mora biti održana da bi funkcija bila sačuvana⁴⁶⁻⁴⁸, npr. RNK polimeraza I i UBF (engl. *upstream binding factor*) ne mijenjaju položaj na kromosomu kroz promjene oblika u staničnom ciklusu čuvajući time diferencijaciju. U novom pristupu jezgrici kao mjestu interakcije, a ne samo kao mjestu sinteze rRNK-a, naglasak je na suradnji molekularnih sustava. U tome je analogija između jezgrice i mozga. Uključivanjem vremena u definiciju jezgrice, primjerice izražaj „kada jezgrica sekvstrira p53“, može se samo pretpostaviti da je bolest vremenska anomalija s prostornim izražajem, patološki „timing“, što prelazi okvir i mogućnosti ovog prikaza.

JEZGRICA DEFINIRANA ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM

Elektronski mikroskop, osim što detaljnije prikazuje strukturu jezgrice većim povećanjem, pokazuje da jezgrica, kao subnuklearni odjeljak, ima subnukleolarne odjeljke. Možda se to čini manje važnim onome tko ne polazi od definicije da je odjeljak (engl. *compartment*) prostor definiran funkcijom, a ne geometrijom. Povezivanje prostor-vremena s funkcijom^{16,32,47-49} značajan je doprinos razumijevanju uloge jezgrice u nastanku bolesti. Zaključak znanstvenika da se aktivna transkripcija ribosomalnih gena zbiva na sučelju fibrilarnih centara (FC) i guste fibrilarne komponente (DFC) spoznaja je da je stvaranje oblika na molekularnoj razini posljedica aktivacije funkcije i nakupljanja produkta bioloških procesa, a ne pregradnje membranom. Nakupljanje produkta (preribosoma) dovodi do vizualizacije granularne komponente (engl. *granular component*; GC) jezgrice u elektronskom mikroskopu. Dvojnomo FISH probom dokazano je usmjereno kretanje pre-rRNK-a (rRNK prekursora): novi transkript udaljava se od otisnog rDNK-a, tj. kretanje zrelih rRNK-a nastavlja se kroz DFC u GC, što znači da je DFC također strukturiran. Time je submikroskopska paradigma FC-DFC-GC oblika^{14,15} ograničena na statičke zone dobivene elektronskim mikroskopom⁴¹.

Informacija o kapacitetu proteinogeneze, spremljena kao potencijalna funkcija u FC-u, aktivna transkripcija ribosomalnih gena na granici FC-a i DFC-a, metaboličko sazrijevanje tipova rRNK-a u DFC-u i udruživanje u oblik preribosoma i ribosoma u GC-u izraz su hijerarhijskog puta zvanog ribosomalna biogeneza⁵⁰. Usmjereno kretanje procesa i pripadnog produkta preoblikuje i udaljava informaciju od izvora. Preoblikovanjem informacija ulazi u nove molekularne komplekse i nove funkcije. Prvobitni produkt, pre-rRNK, sazrijeva u 18S, 5.8S i 28S rRNK te postaje molekularni kompleks (ribonukleoprotein), koji interakcijom ribonukleoproteina postaje zrnice – najjednostavniji točkasti oblik (otuda naziv granularne komponente GC jezgrice).

Funkcionalno oblikovani molekularni sustav jezgrice je organela, a kretanje je proteina u navedenim procesima u najmanju ruku dvosmjerno, do ribosoma i obratno. Nastaju ribosomi na kojima translacijom nastaju proteini koji se vraćaju u jezgru i jezgricu da bi regulirali proces stvaranja ribosoma. Ovo dvosmjerno kretanje posebno je značajno za ribosomalne proteine koji imaju funkciju i u jezgri i u ribosomu, što je bitan faktor u nastanku bolesti. Kompartimentalizacija jezgrice s opisom pripadnih funkcija u kaskadnom slijedu započinje s funkcijom RNK polimeraze^{51,52} iz prethodnog ciklusa. Iako su glavne molekula transkripcijskog ustroja ribosoma RNK polimeraza I i III, jezgrica je otvoreni sustav i u njoj surađuju sva tri tipa RNK polimeraze, direktno ili sintezom proteina koji reguliraju jezgricu^{39,52}.

Morfogeneza jezgrice je prostorno remodeliranje, kako u ontogenezi tako i u filogenezi. Amniota imaju FC i DFC, amniota imaju FC, DFC i GC. Viđena elektronskim mikroskopom jezgrica je bipartitna i tripartitna⁵³.

Elektronska mikroskopija omogućava dodatne markere povezujući veliko povećanje i impregnaciju solima različitih metala (uključujući srebro) s fluorescencijom i imunohistokemijom. Elektronska mikroskopija, fluorescencija i imunohistokemija klasične su metode 20. stoljeća^{54,55}. Koloidno srebro prikazat će argirofilne proteine u svjetlosnom i elektronskom mikroskopu kao i u Western blot analizi proteina koja pokazuje podudarnost argirofilnosti proteina jezgrice i antitijela na te proteine. Time je AgNOR metoda multidiscipli-

narna – uključuje se u svjetlosnu i elektronsku mikroskopiju te ekstrakciju proteina. Elektronska mikroskopija i *in situ* hibridizacija pokazale su da je jezgrica prirodno subnukleolarno kompartimentalizirana i plurifunkcionalna, što je pokrenulo znanstvena istraživanja koja nastoje objasniti odnos strukture i funkcije ne na bazi rigidnih oblika, već na bazi kretanja molekula, a u cilju novih modela terapije.

Formulacija „u jezgri“ označava da su na okupu molekularne sastavnice i oblici te da se funkcija odvija kolokalizacijom molekule s molekulom, molekule s oblikom i oblika s oblikom. Aktivna funkcija okuplja proteine i povećava njihovu koncentraciju u prostoru. Stvaranje oblika prvenstveno se bazira na sporim proteinima jezgrice, dok su brzi proteini u jezgri kratko, u rangu sekunde, stoga je vizualizacija takvih proteina dostupna samo modernim dinamičkim metodama^{16,17}.

PROTEINI JEZGRICE I AgNOR PROTEINI

Najuočljivija i davno opisana kompartimentalizacija stanice prostorno je razdvajanje funkcija citoplazme i jezgre. Jezgra je istaknuta po svojoj jezgri. Kemijski je jezgrica sastavljena od rDNK-a, rRNK-a i proteina koji čine kompaktne strukture^{56,57}. Već su proteini koji ulaze u jezgru i jezgricu plurifunkcionalni i karakterizirani brojnim veznim domenama⁵⁸. Unaprijed prisutni molekularni kompleksi u koje ulazi ključna molekula ubrzavaju biokemijske reakcije⁵⁹ – ostaje otvoreno pitanje smjera kretanja. Proteini jezgrice opisuju se kao: rezidentni (spori) i tranzitorni (brzi). Za funkciju su potrebni jednako spori, kao i brzi proteini. Stoga poremećaj oblika jezgrice (sporih proteina) ukazuje na poremećaj funkcije brzih proteina, a poremećaj brzih proteina remeti oblikovanje jezgrice. Patološki oblik jezgrice govori o poremećaju građe i funkcije ribosoma. Proteini se jezgrice opisuju kao ribosomalni i neribosomalni, histonski i nehistski, proteini koji surađuju u biogenezi ribosoma i proteini koji nisu u direktnoj vezi s biogenezi ribosoma. To ne znači da poremećaj ovih posljednjih nema utjecaja na transkripciju ribosomalnih gena i oblikovanje ribosoma. Kretanje proteina iz citoplazme prema jezgri regulirano je nuklearnim i nukleolarnim lokalizacijskim signalom (NLS-om, odnosno NoLS-om).

Lokalizacijski signali su funkcionalne domene molekula^{60,61} koje omogućavaju organizaciju biološke tvari. Pomoću lokalizacijskog signala spori, jednako kao i brzi proteini, usmjeravaju se prema jezgri, gdje se specifično vezuju na rezidentne komponente, ali i s proteinima koji nisu direktno u funkciji ribosomale biogeneze. Ovdje valja postaviti pitanje otkuda virusima lokalizacijski signali koji njihove proteine usmjeravaju prema jezgri u kojoj se zbiva interakcija funkcionalno heterogenih proteina. I nukleolin i nukleofosmin svojim lokalizacijskim signalima transportiraju viruse. Proteom jezgrice mijenja se kontinuirano i ciklički kao reakcija na promjenu metabolizma^{62,63}. Funkcija rezidentnih proteina značajna je za stabilnost procesa. Nukleolin (C23) i nukleofosmin (B23) najvažnije su molekule u organizaciji transkripcije ribosomalnih gena, a time i proliferacije koja je progresivan proces i bazira se na snažnoj proteinogenezi. Izostanak funkcije proteina u molekularnom kompleksu uzrokuje „gašenje” jezgrice. Velik broj veznih mjesta (funkcionalna strukturiranost) čine nukleolin najvažnijim proteinom jezgrice⁶⁴. Uključen je u sve korake biogeneze ribosoma, a ima funkcije i izvan jezgrice, sve do stanične membrane. Interakcija i fizičko vezivanje nukleolina s rDNK-om i rRNK-om regulira funkciju RNK polimeraze I^{65,66}.

Nukleofosmin je molekula koja brzo i često mijenja položaj, što je značajno ne za njegovu funkciju, već za funkciju proteina koji nukleofosmin nosi. Stres oslobađa poznate proapoptotičke molekularne faktore poput NF- κ B/RelA iz njihovih citoplazmatskih inhibitornih kompleksa, što proteine usmjerava prema jezgri. Pritom je posebno zanimljiv RelA koji se svojim NoLS-om nakuplja u jezgri, što je uzrok da nukleofosmin relokalizira u citoplazmu, što usmjerava Bax protein u mitohondrije i olakšava apoptozu⁶⁷ – proces je bitan za terapijske modele.

Bazična molekula u sazrijevanju ribosoma, a time u funkcije jezgrice, jest fibrilarin, koji je metiltransferaza u oblikovanju malih nukleolarnih RNK-a (engl. *small nucleolar RNA*; snoRNA). Zbog svoje funkcije u cijepanju i sazrijevanju pre-rRNK-a snoRNK-i su marker kancerogeneze i istovremeno metaterapije raka. snoRNK-i su glavni sastojak guste fibrilarne komponente jezgrice, gdje se zbiva njihova funkcija, a informacija za njih nalazi se unutar nekodirajućeg DNK-a⁶⁸.

Opisani rezidentni proteini jezgrice značajni su tijekom cijelog staničnog ciklusa, a brojem ih nadmašuju proteini koji su kratkotrajno u jezgri i reguliraju nekonvencionalne funkcije jezgrice poput staničnog ciklusa⁶⁹, starenja⁷⁰, stanične smrti^{71,72} i virusnih ciklusa⁷³.

Nukleolin, nukleofosmin, fibrilarin, RNK polimeraza I i UBF kiseli su nehistonski i argirofilni (AgNOR) proteini okupljeni oko nukleolarnih organizatora koji ne bi vršili funkciju organizacije jezgrice da nema navedenih proteina. Je li impregnacija interfaznih NOR-a koloidnim srebrom (AgNOR metoda) klasična histokemijska metoda? AgNOR je histokemijska, ali ne i klasična metoda. Specifičnim prikazivanjem nenasumičnog nakupljanja AgNOR proteina oko transkripcijskog ustroja rDNK-a i njihovog kretanja u zdravlju i bolesti, kroz filogenezu i ontogenezu, AgNOR reakcija postaje metoda premošćivanja između klasičnog prikaza proteina histokemijom i modernog prikazivanja dinamike kretanja molekula u stanici s funkcionalnim implikacijama definicije prostora aktivnih ribosomalnih gena, tj. funkcionalne domene jezgrice. Reakcija koloidnog srebra nije molekularno specifična (kao što je imunohistokemija) i prikazuje grupno kretanje proteina. Kako je jezgrica citogenetski oblik, AgNOR proteini ukazuju na prisutnost aktivne funkcije gena. Geni čija je aktivnost samo potencijalno prisutna, ali ne i aktivna, ne nakupljaju AgNOR proteine. Na tome bazira polimorfija rDNK locusa u procesima diferencijacije. Monofunkcionalna definicija jezgrice^{1,57} predstavljena na Simpoziju 1965. glavna je značajka 20. stoljeća, temeljena na vrlo uočljivom produktu procesa, rRNK-u, što je klasična deskriptivna definicija jezgrice. Pokretanjem AgNOR proteina te modernim metodama vizualizacije dobro definirane strukture dobivaju u 21. stoljeću plurifunkcionalnu interpretaciju. Najnovija definicija kaže da se po fizikalnim osobinama jezgricu uspoređuje s tekućinom (engl. *liquid – like behaviour*)⁷⁴.

Učestale cikličke promjene stanice povećavaju potrebu za sintezom ribosoma i proteina. Nije jasno je li pretjerano stvaranje ribosoma u stanicama raka posljedica zloćudne transformacije ili etiopatogenetski prethodi malignitetu⁷⁵. Spoznaja o suradnji ribosomalne biogeneze i signalnih sustava te o patološkom kretanju ribosomalnih i

drugih proteina⁷⁶ u nukleolarnom stresu usmjerilo je istraživanja prema kretanju p53⁷⁷⁻⁹⁹ supresor tumora koji je transkripcijski faktor brojnih gena. DNK i p53 pokazuju veliki afinitet povezivanja čime se pokreću dva različita procesa: zaustavljanje staničnog ciklusa (fosforilacijom p53) i aktivacija brojnih gena (acetilirani p53 djeluje kao transkripcijski faktor). Za acetilaciju p53 zadužene su histon acetilaze, što je neobično za proteine. Na putu prema apoptozi p53 aktivira mitohondrijalne i ekstramitohondrijalne kaspaze. Osim velikog veznog afiniteta, fosforilacije i acetilacije, bitan moment u kontroli proliferacije je stabilizacija p53. Stabilizacija p53 znači da je nukleoplazmatska MDM2 molekula (engl. *mouse double minute 2*), ubikvitin ligaza za destrukciju p53, zauzeta u molekularni kompleks s nekom drugom molekulom. Time je p53 slobodan za funkciju apoptoze^{78,79}. Moderna terapija nastoji stanicu raka specifično uvesti u apoptozu. Oštećenje DNK-a nije dostatno za indukciju p53. Potreban je prekid molekularnih mehanizama jezgrice (engl. *nucleolar disruption*). Takav poremećaj jezgrice oslobađa mnoge faktore u nukleoplazmu – osim B23⁶⁷ bitni su ribosomalni proteini^{77,81,89} i ARF^{90,94} koji je tumor supresor. ARF (p19) je kodiran u istom lokusu kao p14 i p26 (koji su proteini staničnog ciklusa), a ipak različito (engl. *alternative reading frame*; ARF). Nukleofosmin sekvstrira ARF u jezgri. U suprotnom ARF izlazi u nukleoplazmu, veže MDM2 i time stabilizira ulogu p53 u apoptozi. Sekvestracija ribosomalnih proteina u nukleoplazmi dovodi do njihove interakcije s MDM2 ubikvitin ligazom koja, opterećena ribosomalnim proteinima, ne vrši svoju funkciju razgradnje p53 u sustavu proteasoma te nivo p53 raste. Nakupljanje p53 (stabilizacija) uzrokuje stanični arest i apoptozu. Sekvestracija ribosomalnih proteina u jezgri, naprimjer interakcija PICT1 s ribosomalni proteinom RPL11 (engl. *ribosomal protein L11*), sprječava izlazak RPL11 u nukleoplazmu i njegovu interakciju s MDM2. U tom slučaju MDM2 pomaže razgradnju p53, što pogoduje patološkom rastu jer je p53 supresor tumora. Ovo je minimalan uvid u način prekapčanja istih molekula u različite molekularne komplekse što rezultira različitim ishodom u preživljenju stanice. Ne očekuje se od čitatelja da usvoji brojne molekularne faktore signalnih pute-

va koji surađuju u jezgri. Očekuje se od čitatelja da prepozna da je izdvajanje (sekvstracija) normalnih, a pogotovo mutiranih proteina u nepripadne stanične odjeljke (jezgricu, nukleoplazmu, citoplazmu) mehanizam molekularne patologije jer je funkcija ovisna o položaju molekule u molekularnom kompleksu te o suradnji i kretanju molekula. AgNOR proteini, pogotovo nukleolin i nukleofosmin, mijenjaju se s promjenom staničnog ciklusa, a u stresu surađuju s p53. Njihova ekspresija je niska u stanicama koje ne proliferiraju, a naku-

Nekonvencionalni proteini u jezgri pripadaju različitim signalnim sustavima. Poremećaj suradnje signalnih sustava s biogeneom ribosoma nukleolarni je stres. Prepoznata je uloga jezgrice u stresu. Bolest kao poremećaj homeostaze uključuje nukleolarni stres kao izražaj nefiziološkog kretanja proteina. Model ciljane terapija raka je kontrola molekularnih kompleksa jezgrice i promjena signala.

pljaju se u stanicama koje patološki proliferiraju, pri čemu je količina argirofilnih proteina izraz jačine transkripcije ribosomalnih gena u prethodnom ciklusu. Neki AgNOR proteini ostaju pridruženi nukleolarnim organizatorima u vrijeme mitoze. Dokazano je u nukleolarnim, nuklearnim i staničnim ekstraktima da su nukleolin C23, nukleofosmin B23 i fibrilarin glavni argirofilni proteini interfeze, dok su RNK polimeraza I i UBF glavni AgNOR proteini udruženi uz nukleolarne organizatore u mitozu. Ekspresija nukleolina rapidno raste u fazi sinteze. Supresija nukleolina pomoću RNKi (engl. *RNA interference*) dovodi do smanjenja funkcije RNK polimeraze I i porasta p53. U stresu nukleolin napušta jezgricu i u nukleoplazmi ulazi u kompleks s p53⁹⁵. Dokaz da su AgNOR proteini marker proliferacije je porast njihove ekspresije u S-G2 fazi koja je pripremna faza za ulaz u mitozu, što znači da je veći broj stanica u populaciji u fazi sinteze. Porast količine AgNOR proteina ima za posljedicu poremećaj broja i polimorfiju veličine i oblika AgNOR-a¹⁰⁰. Može se zaključiti da, poput virusa, i tumori koriste rezidentne i nekonvencionalne puteve jezgrice mijenjajući kretanje AgNOR proteina i čuvajući kancerozni fenotip. No tumorske stanice imaju fatalnu karakte-

ristiku: narušena je regulacija p53. Stoga je glavni cilj brojnih terapijskih modela pokrenuti nukleolarni stres i uvesti stanicu u apoptozu. Biti ili ne biti u jezgri⁹⁷ pitanje je pobjede homeostaze ili bolesti. Zbog dinamike proteina jezgrica je Ahilova peta stanice^{86,98}.

MORFOFUNKCIONALNI ODNOS AgNOR-A, JEZGRICE I JEZGRE

AgNOR-i su mikroskopski točkasti oblici koji se javljaju solitarno i u nakupinama. Nalaze se isključivo na teritoriju jezgrice i time definiraju položaj jezgrice. Konfokalnim mikroskopom AgNOR-i pokazuju štipčastu i dvojni točkastu konfiguraciju ili nema obojenosti srebrom^{13,101}. Njihova prisutnost obilježava aktivne ribosomalne gene.

Prisutnost neobojenih NOR-a znači da nisu svi nukleolarni organizatori, odnosno svi ribosomalni geni istovremeno aktivni. Ribosomalni geni opisuju se kao aktivni, potencijalno aktivni, inaktivni i utišani, što ovisi i o statusu metiliranja. Jezgrica sadrži kompetentne i nekompetentne nukleolarne organizatore. Kompetentni su NOR-i koji su aktivni u profazi^{102,103}. Broj ribosomalnih gena svojstvo je koje se nasljeđuje. Promjena tipičnog slijeda baza rRNK-a biološke jedinice može biti evolucijski fenomen. Sisavci imaju šest tipova rRNK-a, dva u mitohondriju i četiri u jezgri od kojih je tri kodirano u jezgri na kromosomima 13, 14, 15, 21, 22. Za 18S, 5, 8S i 28S transkripcija je ovisna o RNK polimerazi I, a za 5S transkripcija je ovisna o RNK polimerazi III na kromosomu 1. AgNOR-i su u preparatu presjeci nakupina (engl. *clusters*) kiselih nehistonskih proteina u jezgri.

Eksperimentalno proizvedena jezgrica ukazuje da se interfazni oblik, uz koji se vezuju AgNOR-i, uvijek nalazi tamo gdje je položaj UBF argirofilnog proteina, transkripcijskog faktora RNK polimeraze I¹⁰⁴. U humanom genomu ima 350 kopija ribosomalnih gena po haploidnom setu. Smatra se da broj aktivnih gena opada sa starenjem te pri tome opada broj AgNOR-a koji je najveći u skupini ispitanika starosti od 14 do 29 godina¹⁰⁵. Polimorfija u veličini jezgrice izraz je polimorfije u količini i aktivnosti rDNK-a. Nakon oplodnje jajne stanice sve su jezgrice podrijetlom od majke^{83,84}. Zanimljivo je da u ranoj embrionalnoj fazi enukleolacijom zigote ipak dolazi do stvaranja somatskih jezgrica¹⁰⁶.

Dioba stanice, kao jedinični fenomen proliferacije, počinje profazom i završava telofazom. Logično je da se na metafazni oblik NOR-a koji su argirofilni nadoveže telofazni oblik prenukleolarnog tjelešca (PNB), koje je također argirofilno, ali u kojem još nema *de novo* transkripcije⁴². U njemu se faktori procesuiranja i pre-rRNK iz prethodnog ciklusa udružuju krajem telofaze s početkom G1 i ribosomalnim kromatinom. Time se na PNB aktivacijom transkripcijskog ustroja nadoveže oblikovanje interfazne jezgrice koja u sebi sadrži AgNOR-e, tj. domene nukleolarnih organizatora. Opisana kompletna i inkompletna tjelešca jezgrice kroz interfazu i mitozu izražavaju cjelokupnost proteina jezgrice.

Ono što je privuklo pozornost kliničara je mogućnost kvantitativnog izražavanja intenziteta aktivnosti ribosomalnih gena proučavanjem broja i površine pojedinačnih i grupnih presjeka AgNOR-a^{107,108}. AgNOR reakcija opisana je u gametogenezi, embriogenezi, mitozu, regeneraciji i reparaciji, hipertrofiji i hiperplaziji, metaplaziji i displaziji te u brojnim tipovima neoplazije, drugim riječima u svim proliferativnim procesima. Proliferacije su česta klinička stanja koja traže jednostavnu i nezahtjevnju adjuvantnu metodu poput AgNOR-a u određivanju prognoze proliferativne promjene. Dijagnostički AgNOR reakcija nije prihvaćena, a prikladna je u određivanju agresivnosti rasta unutar prepoznatog tumorskog histotipa. Stopa proliferacije proporcionalna je veličini jezgrice, broju i površini solitarnih i grupiranih AgNOR-a te količini plurifunkcionalnih argirofilnih proteina koji su dostupni jednostavnoj kompjutorskoj analizi kvantitativnih AgNOR parametara uz dobro razrađen softver (morfometrija). Ovisno o metodi prikazivanja, o fazi staničnog ciklusa i djelovanju egzogenih tvari u koje spada i terapija (aktinomycin D) izražaj jezgrice vrlo je raznolik. Danas je teško prihvatiti da je jezgrica samo oblik^{7,29,30,108} koji se vidi samo u interfazi. Jezgrica je oblikovani molekularni sustav, organela čije molekule udruživanjem i razdruživanjem stvaraju oblike, no klasičnim metodama prikazano prisutnost oblika ne znači uvijek i aktivnu funkciju. Aktivacija funkcije sa svakim novim ciklusom stvara interfazni oblik jezgre, jezgrice i AgNOR-a, što je jednostavan argument da su u pitanju oblikovani

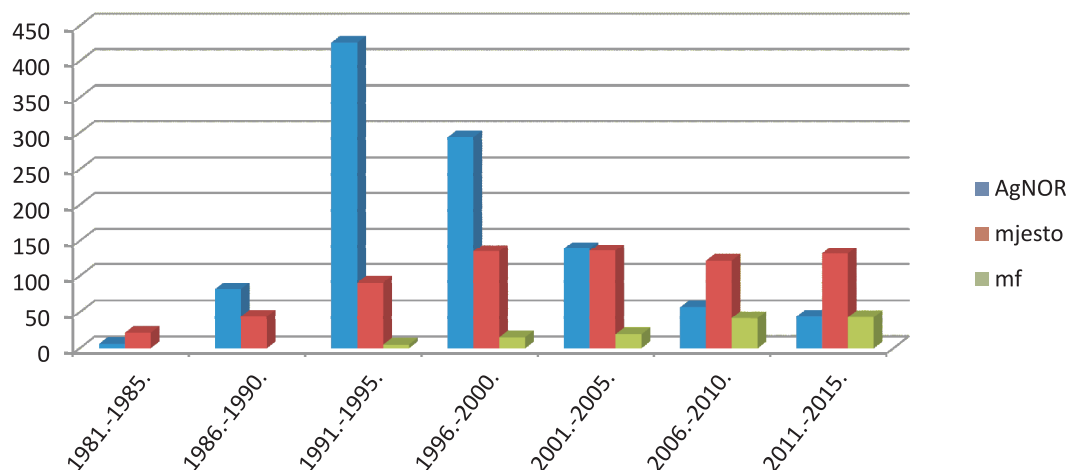
molekularni sustavi: osobina sustava je da se promjenom oblika ne gubi organizacija, a oblici se ciklički ponavljaju. Komparativno proučavanje vizualizacije jezgrice različitim metodama kaže da je organizacija održana i da su različiti oblici jezgrice bez obzira na različit izgled, homologni. Vrijeme teče nastavljanjem oblika na oblik, što se naziva morfogeneza. U zloćudnom rastu polimorfni povećani presjek AgNOR-a prate polimorfna povećana jezgrica i polimorfna povećana hiperkromatska jezgra čiji normalni izgled ovisi o diferencijacijskom tipu. Polimorfija jezgre i jezgrice najranije su opisane osobine zloćudne stanice¹⁰⁹.

GRUPA ZA AgNOR I REZULTATI S APEKSOM

Proučavanje strukture najistaknutije pojave u jezgri nametnulo je pitanje o funkciji. Smatralo se da je pitanje funkcije jezgrice riješeno na Simpoziju 1965., a to je bila definicija da je jezgrica mjesto sinteze rRNK-a. Tridesetak godina kasnije novije su metode omogućile dublji uvid u biokemijske procese i molekularna kretanja glede teritorija ribosomalnih gena, čime su devedesetih godina citogenetske osobine jezgrice privukle pažnju patologa. Prema definiciji jezgrice kao mjesta biogeneze ribosoma, AgNOR-i su postali mjesta aktivnosti rDNK-a, gdje se AgNOR proteini okupljaju oko transkripcijskog ustroja RNK polimeraze I. Promjene u jezgri ukazale su na promjene u ja-

čini transkripcije¹⁰⁷. Jasnouočljiva funkcija poticala je istraživanja ovog jezgrinog teritorija. Skupina proteina oko rezidentnih AgNOR proteina postajala je sve veća. Takav pristup bio je posebno intenzivan u vrijeme aktivnih sastanaka Skupine znanstvenika zaduženih za standardizaciju AgNOR metode (engl. *Committee on AgNOR Quantitation within the European Society of Pathology*, u daljem tekstu „Skupina za AgNOR“). Pregled ključnih riječi koje definiraju jezgricu u bazi PUBMED vodi do zanimljivog zaključka (slika 1). Ključne riječi koje se odnose na doprinos metoda vizualizacije za interpretaciju funkcije jezgrice, poput „jezgrica“ i „ribosomi“, „jezgrica“ i „mjesto“, „jezgrica“ i „multifunkcionalnost“ te „jezgrica“ i „AgNOR“²¹ pokazuju da kombinacija pojmova „jezgrica“ i „AgNOR“ rezultira izgledom krivulje koji ukazuje na „period snažne aktivnosti oko AgNOR-a“.

U samo jednom desetljeću (od 1991. do 2000. godine) našlo se 2/3 analiza jezgrice AgNOR metodom. Krivulja „jezgrica i AgNOR“ obuhvaća više od tisuću prikaza kvantitativne analize broja AgNOR-a i površine AgNOR reakcije, prvenstveno u tumorima. Značaj krivulje nije u kvantitativnim vrijednostima AgNOR-a prikazanim u literaturi, niti u broju referenci o AgNOR-ima, već u koncentraciji brojnih istraživanja u kratkom vremenskom periodu koji definira rad na standardizaciji meto-



Slika 1. U periodu od 1981. do 2015., nakon maksimalne učestalosti od 1991. do 2000., istraživanja AgNOR-a su u padu (plavo). Pri tome pristup jezgri kao „mjestu“ sinteze ribosoma pokazuje plato (crveno). S početkom 21. stoljeća sve se češće jezgricu opisuje kao multifunkcionalnu (mf) organelu (zeleno). Osim što ističe intenzivnu primjenu AgNOR metode u analizi jezgrice u posljednjem desetljeću prošlog stoljeća, slika ukazuje na promjenu u pristupu jezgri koja više nije samo „mjesto“ sinteze rRNK-a, već je multifunkcionalna.

de. Ova se kulminacija u ispitivanju jezgrice koloidnim srebrom, koja u posljednjem desetljeću 20. stoljeća intenzivno vizualizira jezgricu kao citogenetsku pojavu, podudara s organizacijom učestalih radnih sastanaka za evaluaciju metode u praksi. Metoda je standardizirana zaslugom brojnih istraživača i prema uputama Skupine za AgNOR. Citogenetski pristup nukleolarnim organizatorima uveden je u patologiju kao jednostavna i financijski dostupna metoda. AgNOR reakcija jednostavnim oblicima prikazuje kompleksnu organizaciju jezgre u kojoj su AgNOR-i hijerarhijski oblik koji omogućava kvantitativnu analizu podataka. Osvrt na opisano razdoblje ukazuje da je AgNOR metoda postala *zlatni standard*⁸⁹ u rutinskoj analizi materijala dobivenog s onkološke kirurgije i bitan korak u istraživanju tumora histološkim, citološkim i molekularnim pristupom. Za onkologe i terapeute patolozi i citolozi uvode AgNOR analizu kao metodu komplementarnu drugim dijagnostičkim postupcima. Usprkos standardizaciji metode količina AgNOR reakcije izražava količinu argirofilnih proteina u lokusu aktivnih ribosomalnih gena, čija aktivnost ovisi o uvjetima metabolizma, staničnom tipu, stupnju diferencijacije stanice, ravnini presjeka kroz jezgricu, a to su parametri koji se ne mogu kontrolirati u patohistološkom rezu.

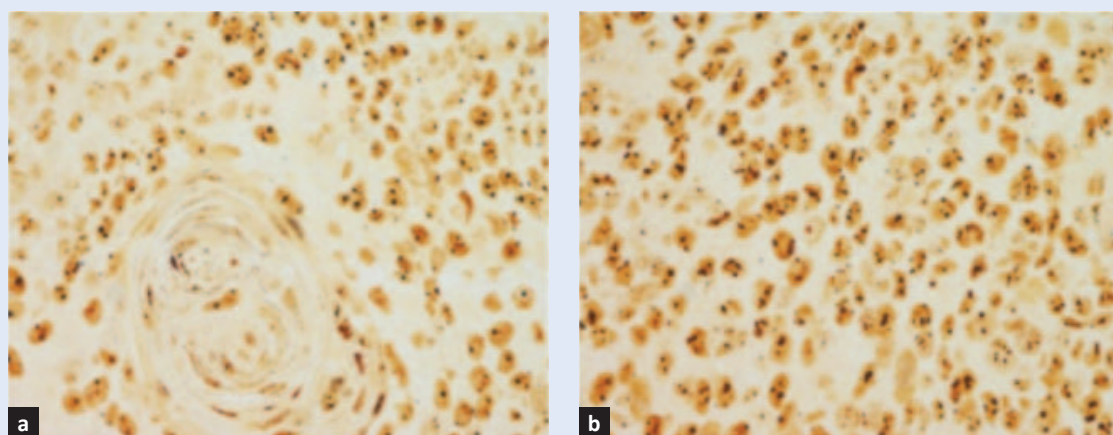
Više od prikaza učestalosti istraživanja tumorskih AgNOR-a, apeks krivulja u slici 1 ukazuje na tijek povijesti proučavanja jezgrice. Za razliku od rutinske HE histokemije, koja vidi isto što i Pianese 1896.¹⁰⁹: izobličene hipertrofične i hiperplastične jezgrice u zloćudnim tumorima, AgNOR-om prikazana jezgrica (slika 2 a i b) usmjerava pažnju na mjesta aktivnosti transkripcijskog ustroja ribosoma^{75,100,110,111}. Danas je transkripcijski ustroj u fokusu interesa zbog razvoja novih terapija koje ciljano smanjuju transkripciju rDNK-a, kako bi se smanjila pretjerana sinteza ribosoma koja podržava patološki rast i izazvao nukleolarni stres koji će tumorsku stanicu uvesti u apoptozu. No put do ove spoznaje bio je dugotrajan. Nukleolarni organizatori (NOR-i) kao metafazni oblici povezani su s jezgicom nakon što je Barbara McClintock³ 1934. zapazila da translokacija NOR-a mijenja mjesto oblikovanja jezgrice. Potom su Caspersson i Schultz⁵⁷ 1940. ukazali da je bit funkcije jezgrice

da se ribonukleinske kiseline nalaze na dva mjesta: i u jezgri i u citoplazmi. Ploton¹² je 1986. godine prikazao metodu bojenja interfaznih nukleolarnih organizatora (AgNOR-i) u odnosu na metafazne oblike NOR-a, prilagođenu za vizualizaciju interfaznih NOR-a u parafinskom rezu. Derenzini i Ploton¹⁴ su početkom devedesetih usporedili histokemijski i elektronsko mikroskopski prikaz jezgrice objasnivši da točkaste nakupine AgNOR proteina, viđene svjetlosnim mikroskopom, odgovaraju fibrilarnim centrima uz koje prijanja gusta fibrilarna komponenta u elektronskom mikroskopu. AgNOR metoda koloidnog srebra prihvaćena je u patologiji. Slijede brojne publikacije u kojima su AgNOR-i jezgrice, kao hijerarhijsko svojstvo okupljanja regulatornih proteina genske funkcije, našli svoje mjesto u patologiji i citologiji tumora i reaktivnih proliferativnih stanja u čemu sudjeluju i hrvatski morfolozi¹¹²⁻¹²¹. Na slici 1 apeks krivulje učestalosti AgNOR publikacija, u kojima se prvenstveno radi o tumorskoj patologiji, ukazuje na nagli porast interesa za funkciju ribosomalnih gena u onkogenezi i uvod je u istraživanje jezgrice dinamičkim molekularnim metodama na ulazu u 21. stoljeće kada dolazi do promjene definicije jezgrice.

Povezivanjem oblika, strukture i funkcije AgNOR metoda ukazuje na razvoj znanstvene misli, te daje uvid u povezanost jezgrice s patološkim stanjima koja su danas opisana molekularnim metodama^{76-80,111,122-132}. Time patologija, molekularna biologija i biotehnologija dobivaju zajednički cilj istraživanja: jezgricu u bolesti, što je vidljivo i ovdje u slici 1 i 2, a u čemu među prvima sudjeluju znanstvenici Medicinskog fakulteta u Rijeci¹³². Danas se razmišlja o mogućoj primjeni tog znanja u terapijske svrhe.

AHILOVA PETA STANICE – DEFINICIJA JEZGRICE I BOLESTI U 21. STOLJEĆU

Jezgrica je jedan od najistaknutijih primjera kongruencije oblika i funkcije u biologiji stanice¹²⁵. Sinteza rRNK-a najsnažniji je metabolički proces u stanici. rRNK nije samo glavni element u strukturi ribosoma. Ona je istovremeno katalitički element u sintezi proteina. Struktura koja samu sebe obnavlja vrlo je osjetljiva na stres. To je posljedica integracije brojnih procesa i komponenti koje in-



Slika 2. Vizualizacija AgNOR-a koloidnim srebrom u stanicama raka grkljana. a) dobro diferencirani tumor s primjerenom količinom AgNOR-a u nukleoplazmi. b) Velik broj polimorfnih AgNOR-a u tumorskim jezgrama kao izraz polimorfije jezgrice primjerene slabo diferenciranom tumoru istog histotipa.

formaciju prenose od rDNK-a do ribosoma da bi se povratnom spregom pomoću novonastalih proteina u istom lokusu regulirale replikacija i transkripcija bez prostornog i vremenskog preklapanja. Tijekom ribosomalne biogeneze molekule ulaze svojim funkcionalnim domenama u različite molekularne komplekse, što ih čini multifunkcionalnim. S druge strane u jezgri različiti signalni sustavi surađuju s biogenezom ribosoma, što jezgricu čini plurifunkcionalnom³⁷. Odsustvo zdravlja očituje se poremećajem oblika, strukture i funkcije. Stoga je mjesto najsnažnije kongruencije oblika i funkcije, jezgri, istovremeno i najosjetljivije mjesto za poremećaj homeostaze. Homeostaza u jezgri ovisi o suradnji proteina i nukleinskih kiselina, proteina i proteina te suradnji nukleinskih kiselina i ribonukleoproteina. Poremećaj organizacije molekularnog kretanja kroz jezgricu nukleolarni je stres.

Kronični nukleolarni stres može promijeniti organizaciju genoma i utemeljiti neoplastičnu patogenezu. Proteini koji sudjeluju u toj organizaciji su nukleolin, fibrilarin, nukleofosmin, RNK polimeraza I, transkripcijski faktor UBF, SL1 i TIF1A (koji su po osobinama rezidentni, neribosomalni i nehistonski), RPL i RPS (koji su ribosomalni proteini, nazvani prema velikoj i maloj podjedinici ribosoma, engl. *large*, odnosno *small*), ekstraribosomalni proteini su regulatorni proteini virusa, apoptoze, staničnog ciklusa, starenja te nukleolarni proteini ribonukleoproteinskog kompleksa SRP (engl. *signal recognition particle*) čija je funk-

cija kotranslacijsko ciljano prepoznavanje polipeptidnog signala i isporuka membranskih i sekretornih proteina s ribosoma u endoplazmatički retikulum. Poremećaj transkripcije, translacije i kretanja ovih proteina u etiopatogenezi je staničnog stresa. Funkcije jezgre u odnosu na sintezu ribosoma definiraju se kao **tradicionalne** (funkcija transkripcije rDNK-a, sinteze, cijepanja i sazrijevanja pre-rRNK-a te udruživanja zrelih rRNK-a u molekularne komplekse ribonukleoproteina i preribosome) i **nekonvencionalne** funkcije jezgre (kofunkcija istih u staničnom ciklusu, hipoksiji, promjeni metabolizma pod utjecajem lijekova, infekciji, te u starenju i apoptozi na osnovi molekularnih interakcija). Poremećaji funkcija jezgre, onih konvencionalnih i onih nekonvencionalnih, čine jezgricu senzorom patoloških signala u nastanku bolesti⁴³.

Biološki stres bazira se na fiziološkim reakcijama u svrhu regulacije homeostaze. Nedavna definicija ukazuje da je stres stanje u kojem pritisak na homeostazu nadilazi regulatorne kapacitete za očuvanje homeostaze, tj. zahtjevi (mikro)okoliša su veći od kapaciteta regulatornih reakcija⁸⁷. Klasifikacija stresa je etiopatogenetska. Stres dobiva naziv prema kauzalnoj patogenezi koju čine stanične reakcije na oštećenje direktno izazvane djelovanjem uzroka. Nukleolarni je stres po etiopatogenezi **replikacijski** (signalnim putem ATR kinaze, engl. *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)–checkpoint kinase 1*), **proteotoksički** (putem patoloških oblika proteina,

engl. *misfolded proteins*), **hipoksični** (signalnim putem VEGF; engl. *vascular endothelial growth faktor*), **lipotoksički** (toksički efekt masnih kiselina i oštećenje u uvjetima oksidativnog stresa i peroksidacije slobodnim radikalima), **genotoksički** (oštećenje i reparacija DNK-a aktiviraju p53 u zdravim stanicama), **metabolički** stres (signalnim putem mTOR; engl. *mechanistic target of rapamycin*). Drugim riječima, procesi i signali koji dovode do oštećenja homeostaze u nabrojenim mehanizmima nukleolarnog stresa reflektiraju se u kretanju molekula kroz jezgricu. Jezgrica je senzor^{43,92} ribosomalnog stresa, tj. ribosomalni stres dovodi do nukleolarnog stresa, a različite etiopatogeneze povezane su putem p53 supresora tumora i regulatora staničnog ciklusa. Kronični je stres bolesno stanje, poremećaj homeostaze na svim razinama organizacije biološke strukture i funkcije, što uključuje i stres koji se odvija u jezgri zbog nefiziološkog kretanja proteina, posebno p53. Navedeni primjeri etiopatogeneze mehanizmi su nastanka različitih bolesti¹²⁷.

DEFINICIJA BOLESTI USMJERAVA TERAPIJU

Molekularna patologija definira bolest kao poremećaj organizacije molekula, a time i organizacije jezgrice i ribosoma, koji je prisutan u patogenezi poremećaja staničnog ciklusa, ribosomalne biogeneze, starenja, infektivnih oštećenja, neoplazije i malformacije. **Nukleolopatije** su multisistemske bolesti koje se temelje na mutaciji proteina jezgrice ali bez jasnog genotipa ili fenotipa, uz poremećaj pomaka okvira čitanja u ribosomu. Kodiraju se skraćeni polipeptidi nedostatne funkcije koji čine jezgricu osjetljivom na promjene u transkripciji. O jezgri ovisi embrionalni razvoj mozga¹³³. **Ribosomopatije**, poremećaji biogeneze i funkcije ribosoma, pretežno su kongenitalni poremećaji uzrokovani patološkim ribosomalnim proteinima i/ili drugim faktorima nužnim za procesuiranje rRNK-a¹²⁹. Razlike u reakciji na ribosomalni stres i razlike u ekspresiji zahvaćenih gena uzrok su različitim kliničkim fenotipovima. Osobina ribosomopatija je da hipoproliferativna stanja oštećenog tkiva prelaze u hiperproliferativna uz čestu pojavu anemije i neoplazije. U ovoj se skupini spominju X-vezana kongenitalna diskertoza¹³⁴, anemija Diamond-Blackfana¹²⁵ i mandibulofacijalna dizostoza

Treacher-Collinsa⁸⁰. U doba kada se tek prepoznala povezanost jezgrice i bolesti prva su saznanja o proteinima jezgrice dobivena od pacijenata s autoimunim oboljenjem. Nedavno je ukazano na povezanost autoimunskih bolesti s reaktivacijom X kromosoma¹²⁴, na mutirani protein cirhin kod dječje ciroze¹³⁰, na značaj nukleostemina u kardioprotektivnoj terapiji¹³⁵, a za prisutnost antitijela na fibrilarni i nukleolin u sistemskim autoimunim bolestima odavno se zna¹³¹. Više ne iznenađuje kada se prikažu novi dokazi o prisutnosti regulatornih proteina virusa u jezgri⁷⁴. Stoga je općeprihvaćen značaj poznavanja jezgrice za brojne kliničke struke. Dijagnostički oblik jezgrice od manjeg je značaja, osim za krupne deformirane eozinofilne nukleole u pojedinim agresivnim tumorima te uočljivosti segregacije jezgrice kao znaka djelovanja genotoksičke terapije. Potrebno je dijagnosticirati molekularna kretanja u nukleolarnom stresu koji je poseban faktor u patogenezi jer ukazuje na mogućnost zaštite jezgrice od stresa u preventivnoj medicini. Jezgrica je samo jedna od razina na kojima se stres odvija.

MALE MOLEKULE U TERAPIJI RAKA

Jezgrica je biološki oblik i funkcionalna domena stanične jezgre koja opstaje kompleksnom interakcijom između transkripcije ribosomalnih gena i proteina brojnih signalnih molekularnih sustava. U jezgri stanice raka biogeneza ribosoma i transkripcijska funkcija RNK polimeraze I patološki su povišene i pojačani su mehanizmi opstanka stanice, dok je funkcija p53 proapoptotičkog supresora tumora neprimjerena. Tim načinom stanica raka čuva svoj transformirani fenotip.

Klasična protutumorska terapija poput Actinomycina D (AMD), doxorubicina, camptothecina, 5-fluorouracila, remeti biogenezu ribosoma. AMD se umetne u strukturu koja je bogata gvanin-citozin parovima baza. Cisplatin stižava transkripciju ovisnu o RNK polimerazi I stvaranjem unakrsnih veza između DNK-a i proteina i time ometa molekularni kompleks s UBF-om (engl. *upstream binding factor*), glavnim transkripcijskim faktorom RNK polimeraze I. 5'fluorouracil inhibira sintezu nukleotida. Inhibitori topoizomeraze stvaraju patološke molekularne komplekse s topoizomerazom I.

Očekuje se da moderna terapija tumora djeluje sveobuhvatno a ciljano. Ravnotežu između staničnog rasta i proliferacije s jedne strane te programirane stanične smrti s druge regulirana je interakcijom proapoptotičkog p53 supresora tumora s molekularnim signalima IGF1 – AKT – mTOR (engl. *insulin like growth factor, AK mouse bred Thymoma*, odnosno *mechanistic target of rapamycin*) koji čuvaju preživljenje stanice. U terapiji uznapredovalog raka bubrežnih stanica Everolimus je rapalog koji inhibira mTORC, mTOR komponentu koja u normalnoj stanici negativnom povratnom spregom regulira AKT kinazu. Izostanak mTORC1 signala i povišena AKT kinaza remete RNK-glasnike proteina staničnog ciklusa i glikolize što inhibira rast i proliferaciju tumora.

Novi modeli moderne kemoterapije baziraju se na ciljanoj selektivnoj inhibiciji transkripcijske funkcije RNK polimeraze I s premissom da zaustavljanje transkripcije rDNK-a u rRNK inducira nukleolarni stres koji će stanicu raka specifično i selektivno odvesti u apoptozu s ciljem očuvanja zdravih stanica u kojima put p53 nije oštećen i koje se mogu adaptirati na stres.

U inhibiciji transkripcije ribosomalnih gena koja će dovesti do nukleolarnog stresa nukleolin/rDNK kompleks meta je CX-3543¹³⁵ molekule koja uzrokuje otpuštanje nukleolina s veznih mjesta u locusu rDNK-a.

U terapiji akutne limfoblastične leukemije CX-5461^{43,136} je molekula koja aktivira ATM/ATR put (engl. *ataxia telangiectasia-mutated*, ATM, odnosno *ATM and Rad3-related*, ATR) i zaustavlja stanicu u G2 fazi uz indukciju apoptoze. U tijeku su klinička ispitivanja snažnog i specifičnog inhibitora telomerase, GRN163L, a govori se i o nekoliko tipova terapijskih cjepiva na bazi telomerase¹³⁷. Mali molekularni inhibitori RNK polimeraze I induciraju nukleolarni stres da bi omogućili specifičnu aktivaciju supresora tumora p53.

BMH-1 terapija putem proteasoma dovodi do destrukcije RPA194, glavne sastavnice kompleksa RNK polimeraze I, zaustavlja rRNK sintezu i izaziva segregaciju i nukleolarni stres¹³⁸. Direktna indukcija BAX proteina malim molekulama koje omogućavaju aktivaciju apoptoze direktnim vezivanjem na protein nova je paradigma farmakoterapije.

Ispitana je i mogućnost protutumorske terapije putem interferencije s mehanizmima stišavanja ribosomalnih gena. Nukleometilin (NML) je protein jezgrice s afinitetom za rRNK. Sirtuin (SIRT1) je protein koji stišava funkciju jezgrice u uvjetima hipotrofije i deacetilira p53 (što može utjecati na njegovo vezivanje na promotor p21 proteina). Nukleometilin ima mogućnost vezati SIRT1 ili rRNK. Olakšano vezivanje NML-rRNK-a sprječava stvaranje NML-SIRT1 kompleksa. Time novostvoreni rRNK povratnom spregom priječi stišavanje aktivnih ribosomalnih gena. S druge strane u procesu starenja nastaju molekularni kompleksi između NML i SIRT1 (što dovodi do represije transkripcije ribosomalnih gena i smanjenja potrošnje energije). U stanicama raka je SIRT1 mRNK povišen no mali molekularni inhibitori SIRT1 ne postižu antiproliferativnu aktivnost, tj. blokada sirtuina nije dostatna za stišavanje aktivnosti ribosomalnih gena iako poremećaj u stišavanju transkripcije rDNK-a pogoduje recidivnom rastu tumora¹³⁹.

Ukratko se mogu spomenuti i sljedeći modeli terapije. U svrhu terapije transfekcijom gena se P53 unosi u tumorske stanice adenovirusnim vektorom. Onkolitički virusi ciljano uništavaju stanice s mutacijom p53. Funkciju negativnih regulatora p53 (poput MDM2) moguće je inhibirati pomoću malog RNKi. Malim molekulama moguće je utjecati na strukturu mutiranog proteina i aktivirati p53. Inhibicija histon deacetilaza također aktivira p53.

U odnosu na navedene mehanizme direktnom blokadom transkripcijskog ustroja ribosomalnih gena inaktivacijom RNK polimeraze I⁴³ nastaje nukleolarni stres koji prirodno aktivira p53. Povećanu osjetljivost stanica raka na inhibitore sinteze RNK-a podržavaju već narušeni mehanizmi regulacije staničnog ciklusa, aktivacije onkogeni i oporavka DNK-a, zbog čega pojačani nukleolarni stres aktivira mehanizme apoptoze bez obzira na mutaciju supresora tumora.

Opisani modeli terapije raka predlažu dva načina indukcije apoptoze u tumorskoj stanici: 1. direktno, ili 2. zaobilazno putem aktivacije p53 i indukcijom nukleolarnog stresa na koji su stanice raka osjetljivije od zdravih netransformiranih stanica. Pri tome ne dolazi do genotoksičkog stresa.

ZNAČAJ JEDINSTVENE ORGANELE ZA MEDICINSKE ZNANOSTI – PRAKTIČNE I FILOZOFSKE IMPLIKACIJE

Definicija bolesti kao odstupanja od fizičkog, psihičkog i socijalnog dobrog osjećanja nije znatno promijenjena upoznavanjem jezgrice. Upravo je mjesto odstupanja od fiziološkog kretanja molekula i molekularnih kompleksa ciljno mjesto djelovanja modernih terapija. Nove nanotehnologije omogućuju terapiju koja zaobilazi biološke barijere, oslanja se na mikrookoliš tumorskih stanica i poboljšava isporuku lijeka, stoga je potrebno dobro upoznati razlike između zdravog i tumorskog tkiva u svrhu primjene i praćenja moderne ciljane terapije.

AgNOR-i prikazuju funkcionalnu lokalizaciju kiselih nehistskih proteina i ukazuju na kvantitativne razlike između fiziološkog i patološkog mikrookoliša jezgrine domene. U tome je još jedna od značajki vrlo intenzivnog ispitivanja AgNOR-a u posljednjem desetljeću prošlog stoljeća – AgNOR-i definiraju mikrookoliš transkripcijskog ustroja RNK polimeraze I koji je ciljno mjesto modernih terapijskih modela. Štoviše, prikazom različitog pristupa jezgrici u duljem vremenskom periodu, slika 1 pokazuje da nakon intenzivnog ispitivanja funkcije AgNOR-a jača spoznaja da je jezgrica plurifunkcionalna. U tome je razlika prema klasičnoj deskriptivnoj definiciji monofunkcionalne jezgrice iz razdoblja prije intenzivnog proučavanja AgNOR-a u patologiji.

Drugim riječima, slika 1 ukazuje na razdoblje promjene definicije jezgrice. Potaknuto intenzivnom vizualizacijom funkcionalne strukture jezgrice AgNOR metodom u literaturi slijede prikazi brojnih proteina u jezgrici koji nisu direktno u vezi s biogene- zom ribosoma. Ako su AgNOR-i mjesta okupljanja rezidentnih i uz njih brojnih drugih proteina jezgrice, čini li masa proteina jezgricu velikom? Da, jer je promjena definicije veliki događaj u načinu interpretacije funkcije jezgrice. Deskriptivna definicija jezgrice bazira se samo na vrlo uočljivoj nakupini rRNK-a u jezgri. Upravo je prisutnost „brojnih i neočekivanih” proteina u jezgri dugo- godišnji refren „jezgrica je mjesto sinteze ribosoma” pretvorilo u orkestralnu izvedbu „jezgrica je mjesto gdje proteini brojnih molekularnih sustava susreću biogenezu ribosoma”. Ovo je funkcionalna

definicija jezgrice. Obje definicije dobivene su istim, morfološkim metodama, ali su klasične metode statičke, a moderne dinamičke.

Sa stanovišta kliničara, jezgrica donosi nova saznanja o patogenezi bolesti te predstavlja obećavajuće ciljno mjesto djelovanja novih terapija. Proteini jezgrice pripadaju upalnim, regenerativnim i degenerativnim procesima, malformaciji i neoplaziji i efektor su epigenetskih promjena. Slika 2 a i b prikazuje razliku u distribuciji AgNOR-a vizualiziranih koloidnim srebrom u pacijenata s neoplazijom istog histotipa a različite dinamike rasta, što je značajno za prognozu, klasifikaciju tumora, a time i terapiju.

Jezgrica ostaje fascinantni misterij, prisutan svakodnevno u našim stanicama¹⁴⁰. Utemeljeni deskriptivni pristup jezgri i klasične metode vizualizacije biološke strukture i dalje će imati svoje mjesto u patobiologiji stanice i biti podrška u ispitivanju funkcionalne strukture. Je li istraživanje jezgrice, osim za biološke znanosti, od sustavnog značaja? Poseban moment u definiciji zdravlja je dobro osjećanje. Dokaz su pacijenti s minornim anomalijama koji su postigli kvalitetu življenja. To ukazuje na značaj opće društvene misli u medicinskoj znanosti. Odgovor na pitanje pomaže li znanost čovjekovu boljitku i općenito napretku može se dijelom naći u ovom napisu. Zadatak funkcionalne anatomije jezgrice prikazane AgNOR-om je klasično jednostavan, ekonomski isplativ i egzaktno, pomažući time razvoj sofisticiranih tehnologija u istraživanju mjesta djelovanja kompleksnih terapija nukleolarnog stresa. Nukleolarni stres poseban je trenutak u patogenezi i ukazuje na mogućnosti preventivne medicine, jer jezgrica je samo jedna od razina na kojima se stres odvija.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Vincent WS, Miller OL. International symposium on the nucleolus: its structure and function. Natl Cancer Inst Monogr 1966;23:1-610.
2. Heitz E. Die Ursache der gesatzmassigen Zahl, Lage und Form pflanzlicher Nukleolen. Planta 1931;12:775-844.
3. McClintock B. The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea mays. Z. Zellforsch Mikrosk 1934;21:294-398.
4. Ritossa FM, Spiegelman S. Localization of DNA complementary to rRNA in the nucleolus organizer of Drosop-

- hila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965;53:737-45.
5. Flechon JE, Kopečný V. The nature of the 'nucleolus precursor body' in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. *Zygote* 1998;6:183-91.
 6. Tantravahi R, Miller DA, Dev VG, Miller OJ. Detection of nucleolus organizer regions in chromosomes of human, chimpanzee, gorilla, orangutan and gibbon. *Chromosoma* 1976;56:15-27.
 7. Montgomery TH. Comparative cytological studies with special regard to the morphology of nucleolus. *J Morphol* 1898;15:265-582.
 8. Hadjiolov AA. Ribosome biogenesis in the life cycle of normal and cancer cells. *In: The nucleolus and ribosome biogenesis*. Wien, New York: Springer-Verlag, 1985: 165-95.
 9. Leary DJ, Terns MP, Huang S. Components of U3 snoRNA-containing complexes shuttle between nuclei and the cytoplasm and differentially in nucleoli: implications for assembly and function. *Mol Biol Cell* 2004;15: 281-93.
 10. Sokka M, Rilla K, Miinalainen I, Helmut Pospiech H, Syväoja JE. High levels of TopBP1 induce ATR-dependent shut-down of rRNA transcription and nucleolar sequestration. *Nucleic Acids Res* 2015;43:4975–89.
 11. Anastassova-Kristeva M. The nucleolar cycle in man. *J Cell Sci* 1977;25:103-10.
 12. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem J* 1986;8:5-14.
 13. Heliott L, Kaplan H, Lucas L, Klein C, Beorchia A, Doco-Fenzy M, Menager M et al. Electron tomography of metaphase nucleolar organizer regions: evidence for a twisted-loop organization. *Mol Biol Cell* 1997;8:2199-216.
 14. Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int Rev Exp Pathol* 1991;32:150-92.
 15. Derenzini M, Pasquinielli G, O'Donohue MF, Ploton D, Thiry M. Structural and Functional Organization of Ribosomal Genes within the Mammalian Cell Nucleolus. *J Histochem Cytochem* 2000;54:131-45.
 16. Hernandez-Verdun D. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus* 2011;2:189-94.
 17. Olson MOJ. Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE* 2004;2004:10.
 18. Akagi S, Matsukawa K, Takahashi S. Factors affecting the development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *J Reprod Dev* 2014;60:329-35.
 19. Miller DA, Dev VG, Tantravahi R, Miller OJ. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp Cell Res* 1976;101:235-43.
 20. Tucker S, Vitins A, Craig S, Pikaard CS. Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:351-6.
 21. Cremer T, Cremer M. Chromosome Territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a003889.
 22. Kahl G. 2015. *The Dictionary of Genomics, Transcriptomics and Proteomics*. 5th ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2015;1539.
 23. Lam YW, Lamond AI, Mann M, Andersen JS. Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr Biol* 2007;17:749-60.
 24. Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI et al. Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 2005;433:77-83.
 25. Kordan HA, Preston RD. Birefringence in Unfixed Lemon Fruit Nucleoli. *Nature* 1967;216:1105-6.
 26. Brown DD, Gudron JB. Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964;51:139-46.
 27. Derenzini M, Hernandez-Verdun D, Pession A, Novello F. Structural organization of chromatin in nucleolar organizer regions of nucleoli with a nucleolonema-like and compact ribonucleoprotein distribution. *J Ultrastruct Res* 1983;84:161-72.
 28. Tantravahi R, Breg WR, Verteletski W, Erlanger BF, Miller OJ. Evidence for methylation of inactive human rRNA genes in amplified regions. *Hum Genet* 1981;56:315-20.
 29. Goodpasture C, Bloom SE. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 1975;53:37-50.
 30. Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 1980;36:1014-5.
 31. Kittur N, Zapantis G, Aubuchon M, Santoro N, Bazett-Jones DP, Meier T et al. A new structure observed in the nucleolus of the human endometrial epithelial cell. *Am J Obstet Gynecol* 1963;86:430-2.
 32. Meldi L, Brickner JH. Compartmentalization of the nucleus. *Trends Cell Biol* 2011;21:701-8.
 33. Morris GE. The Cajal body. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research* 2008;1783:2108-15.
 34. Matera AG, Izaguirre-Sierra M, Praveen K, Rajendra TK. Nuclear Bodies: random aggregates of sticky proteins or crucibles of macromolecular assembly? *Dev Cell* 2009;17:639-47.
 35. Pederson T. The Nuclear Physique. *In: Hancock R, Jeon KW (eds). Potential functional significance of phase separation for nuclear compartmentalization. New Models of the Cell Nucleus: Crowding, Entropic Forces, Phase Separation and Fractals. International Review of Cell and Molecular Biology* 307. Amsterdam: Elsevier, 2014:15-28.
 36. Hernandez-Verdun D, Louvet E, Muro E. Time-lapse, photoactivation, and photobleaching imaging of nucleolar assembly after mitosis. *Methods Mol Biol* 2013;1042:337-50.
 37. Trendelenburg MF, Zatzepina OV, Waschek T, Schlegel W, Tröster H, Rudolph D et al. Multiparameter microscopic analysis of nucleolar structure and ribosomal gene transcription. *Histochem Cell Biol* 1996;106:167-92.
 38. Pederson T. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 1998;26:3871-6.
 39. Stimpson KM, Sullivan LL, Kuo ME, Sullivan BA. Nucleolar organization, ribosomal DNA array stability and acrocentric chromosome integrity are linked to telomere function. *PLoS ONE* 2014;9:e92432.
 40. Shishova KV, Zharskaya CO, Zatzepina CO. The Fate of the Nucleolus during Mitosis: Comparative Analysis of Localization of Some Forms of Pre-rRNA by Fluorescent in Situ Hybridization in NIH/3T3 Mouse Fibroblasts. *Acta Naturae* 2011;3:100-6.

41. Dunder M, Misteli T, Olson MOJ. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J Cell Biol* 2000;150:433-46.
42. Muro E, Gébrane-Younis J, Jobart-Malfait A, Louvet E, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The traffic of proteins between nucleolar organizer regions and prenucleolar bodies governs the assembly of the nucleolus at exit of mitosis. *Nucleus* 2010;1:202-11.
43. Quin JE, Devlin JR, Cameron D, Hannan KM, Pearson RB, Hannan RD. Targeting nucleolus for cancer intervention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 2014;1842:802-16.
44. Nierras CR, Liebman SW, Warner JR. Does Saccharomyces need an organized nucleolus? *Chromosoma* 1997;105:444-51.
45. Melese T, Xue Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:319-24.
46. McCann KL, Baserga SJ. Driving nucleolar assembly. *Genes Dev* 2014;28:211-3.
47. Shi Z, Barna M. Translating the genome in time and space: specialized ribosomes, RNA regulons, and RNA-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2015;31:31-54.
48. Hernandez-Verdun D. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol* 2006;125:127-37.
49. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Gébrane-Younès J. Emerging concepts of nucleolar assembly. *J Cell Sci* 2002;115:2265-70.
50. Lazdins IB, Delannoy M, Sollner-Webb B. Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization. *Chromosoma* 1997;105:481-95.
51. Hozak P, Cook PR, Schofer C, Mosgoller W, Wachter F. Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J Cell Sci* 1994;107:639-48.
52. Strouboulis J, Wolffe AP. Functional compartmentalization of the nucleus. *J Cell Sci* 1996;109:1991-2000.
53. Thiry M, Lamaye F, Lafontaine DL. The nucleolus: when 2 became 3. *Nucleus* 2011;2:289-93.
54. Pederson T. The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a000638.
55. Pederson T. Movement and localization of RNA in the cell nucleus. *FASEB J* 1999;13 Suppl 2:S238-42.
56. Svistunova DM, Musinova YR, Polyakov VYu, and Sheval EV. A simple method for the immunocytochemical detection of proteins inside nucleoli that are inaccessible to specific antibodies. *J Histochem Cytochem* 2012;60:152-8.
57. Caspersson T, Schultz J. Ribonucleic acid in both nucleus and cytoplasm, and the function of the nucleolus. *Biochemistry* 1940;26:507-15.
58. Tajrishi MM, Tuteja R, Tuteja N. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun Integr Biol* 2011;4:267-75.
59. Root-Bernstein RS, Dillon PF. Molecular Complementarity I: the Complementarity Theory of the Origin and Evolution of Life. *Journal of Theoretical Biology* 1997;188:447-79.
60. Fujiwara Y, Fujiwara K, Goda N, Iwaya N, Tenno T, Shirakawa M et al. Structure and function of the N-terminal nucleolin binding domain of nuclear valosin-containing protein-like 2 (NVL2) harboring a nucleolar localization signal. *J Biol Chem* 2011;286:21732-41.
61. Emmott E, Hiscox JA. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep* 2009;10:231-8.
62. Lam YW, Trinkle-Mulcahy L. New insights into nucleolar structure and function. *F1000Prime Rep* 2015;7:48.
63. Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI. Toward a high-resolution view of nuclear dynamics. *Science* 2007;318:1402-7.
64. Dickinson LA, Kohwi-Shigematsu T. Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with high base-unpairing potential. *Mol Cell Biol* 1995;15:456-65.
65. Roger B, Moisand A, Amalric F, Bouvet P. Repression of RNA polymerase I transcription by nucleolin is independent of the RNA sequence that is transcribed. *J Biol Chem* 2002;277:10209-19.
66. Drygin D, Siddiqui-Jain A, O'Brien S, Schwaeb M, Lin A, Bliesath J et al. Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res* 2009;69:7653-61.
67. Khandelwal N, Simpson J, Taylor G, Rafique S, Whitehouse A, Hiscox J et al. Nucleolar NF- κ B/RelA mediates apoptosis by causing cytoplasmic relocalization of nucleophosmin. *Cell Death Differ* 2011;18:1889-903.
68. Stepanov GA, Filippova JA, Komissarov AB, Kuligina EV, Vladimir A, Richter VA et al. Regulatory Role of Small Nucleolar RNAs in Human Diseases. *BioMed Research International* 2015;2015:ID 206849.
69. Thoms HC, Malcolm G, Dunlop, Lesley A. Stark. p38-mediated inactivation of cyclin D1/Cyclin-dependent kinase 4 stimulates nucleolar translocation of RelA and apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:1660-9.
70. Cornu M, Albert V, Hall MN. mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2013;23:53-62.
71. Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C et al. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 2004;431:80-4.
72. Pestov DG, Strezoska Z, Lau LF. Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol* 2001;21:4246-55.
73. Stauber RH, Afonina E, Gulnik S, Erickson J, Pavlakis GN. Analysis of intracellular trafficking and interactions of cytoplasmic HIV-1 Rev mutants in living cells. *Virology* 1998;251:38-48.
74. Brangwynne CP, Mitchison TJ, Hyman AA. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:4334-9.
75. Montanaro L, Trere D, Derenzini M. Nucleolus, Ribosomes, and Cancer. *Am J Pathol* 2008;173:301-10.
76. Ponti D, Bastianelli D, Rosa P, Pacini L, Ibrahim M, Rendina EA et al. The expression of B23 and EGR1 proteins is functionally linked in tumor cells under stress conditions. *BMC Cell Biol* 2015;16:27.
77. Havel JJ, Li Z, Cheng D, Peng J, Fu H. Nuclear PRAS40 couples the Akt/mTORC1 signaling axis to the RPL11-HDM2-p53 nucleolar stress response pathway. *Oncogene* 2015;34:1487-98.
78. Lee HJ, Kim JM, Kim KH, Heo JI, Kwak SJ, Han JA. Genotoxic stress/p53-induced DNAJB9 inhibits the pro-apoptotic

- totic function of p53. *Cell Death and Differentiation* 2015;22:86-95.
79. Leszczynska KB, Foskolou IP, Abraham AG, Anbalagan S, Tellier C, Haider S et al. Hypoxia-induced p53 modulates both apoptosis and radiosensitivity via AKT. *J Clin Invest* 2015;125:2385-98.
 80. Ackerman D, Celeste Simon M. Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment. *Trends Cell Biol* 2014;24:472-8.
 81. Chen D, Huang S. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol* 2001;153:169-76.
 82. Cui F, Zhurkin VB. Rotational positioning of nucleosomes facilitates selective binding of p53 to response elements associated with cell cycle arrest. *Nucl Acids Res* 2014;42:836-47.
 83. Goudarzi KM, Nister M, Lindström MS. mTOR inhibitors blunt the p53 response to nucleolar stress by regulating RPL11 and MDM2 levels. *Cancer Biol Ther* 2014;15:1499-514.
 84. James A1, Wang Y, Raje H, Rosby R, DiMario P. Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus* 2014;5:402-26.
 85. Tsoi H, Chana HYE. Roles of the nucleolus in the CAG RNA-mediated toxicity. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease* 2014;1842:779-84.
 86. Vlatkovic N, Boyd MT, Rubbi CP. Nucleolar control of p53: a cellular Achilles' heel and a target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:771-91.
 87. Wang J, Wan X, Zhu H, Lu C, Yu W, Yu C et al. Lipotoxic effect of p21 on free fatty acid-induced steatosis in L02 cells. *PLoS ONE* 2014;9:e96124.
 88. Erickson JD, Bazan NG. Nucleolus fine-tunes orchestration of an early neuroprotection response in neurodegeneration. *Cell Death Differentiation* 2013;20:1435-7.
 89. Suzuki A, Kogo R, Kawahara K, Sasaki M, Nishio M, Mae-hama T et al. A new PICTURE of nucleolar stress. *Cancer Sci* 2012;103:632-37.
 90. Lirussi L, Antoniali G, Vascotto C, D'Ambrosio C, Poletto M, Romanello M et al. Nucleolar accumulation of APE1 depends on charged lysine residues that undergo acetylation upon genotoxic stress and modulate its BER activity in cells. *Mol Biol Cell* 2012;23:4079-96.
 91. Avitabile D, Bailey B, Cottage CT, Sundararaman B, Joyo A, McGregor M. Nucleolar stress is an early response to myocardial damage involving nucleolar proteins nucleostemin and nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:6145-50.
 92. Brooks C, Gu W. The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Prot Cell* 2011;2:456-62.
 93. Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B, de Boer SF, Flügge G, Korte SM et al. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35:1291-301.
 94. Ma H, Pederson T. Depletion of the nucleolar protein nucleostemin causes G₁ cell cycle arrest via the p53 pathway. *Mol Biol Cell* 2007;18:2630-35.
 95. Rubbi CP, Milner J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J* 2003;22:6068-77.
 96. Daniely Y, Dimitrova DD, Borowiec JA. Stress-dependent nucleolin mobilization mediated by p53-nucleolin complex formation. *Mol Cell Biol* 2002;22:6014-22.
 97. Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I. To be or not to be in the nucleolus. *Nature Cell Biology* 2000;2:E107-12.
 98. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman PN, Prives C et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 1991;252:1708-11.
 99. Budde A, Grummt I. p53 represses ribosomal gene transcription. *Oncogene* 1999;18:1119-24.
 100. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron* 2000;31:121-6.
 101. Héliot L, Mongelard F, Klein C, O'Donohue MF, Chassery JM, Robert-Nicoud M et al. Nonrandom distribution of metaphase AgNOR staining patterns on human acrocentric chromosomes. *J Histochem Cytochem* 2000;48:13-20.
 102. Virant-Klun I. Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings. *Stem Cells Cloning* 2015;8:49-60.
 103. Kalmárová M, Smirnov E, Koberna K, Lígasová A, Popov A, Raška I. Positioning of NORs and NOR-bearing chromosomes in relation to nucleoli. *J Struct Biol* 2007;160:49-56.
 104. Grob A, McStay B. Construction of synthetic nucleoli and what it tells us about propagation of sub-nuclear domains through cell division. *Cell Cycle* 2014;13:2501-8.
 105. Saito M, Shimizu Y. Age-related changes in cellular activity in human submandibular glands as evaluated by argyrophilic nucleolar organizer regions. *Gerodontology* 1999;16:29-36.
 106. Ogushi S, Palmieri C, Fulka H, Saito M, Miyano T, Fulka J Jr. The Maternal Nucleolus Is Essential for Early Embryonic Development in Mammals. *Science* 2008;319:613-6.
 107. Derenzini M, Sirri V, Trere D, Ochs RL. The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells. *Lab Invest* 1995;73:497-502.
 108. Ofner D, Schmid KW. Standardized AgNOR analysis: its usefulness in surgical oncology. *Histochem Cell Biol* 1996;106:193-6.
 109. Pianese G. Beitrag zur Histologie und Aetiologie der Carcinoma. *Histologische und experimentelle Untersuchungen. Beitr Pathol Anat Allg Pathol* 1896;42:1-193.
 110. Hernandez-Verdun D. Structural organization of the nucleolus in mammalian cells. *Methods Achiev Exp Pathol* 1986;12:26-62.
 111. Muro E, Hoang TQ, Aude Jobart-Malfait A, Hernandez-Verdun D. In nucleoli, the steady state of nucleolar proteins is leptomycin B-sensitive. *Biol Cell* 2008;100:303-13.
 112. Mahovlić V. Morfometrijski i kinetički parametri (AgNOR, DNK-citometrija) u citodijagnostici hiperplastičnog i malignog endometrija [Morphometric and kinetic parameters (AgNOR, DNA cytometry) in cytodiagnosics of hyperplastic and malignant endometrium]. Sveučilište u Zagrebu: 2010. PhD thesis.
 113. Verša-Ostojić D, Stanković T, Štemberger-Papić S, Vrdoljak-Mozetić D, Manestar M, Krašević M. Nuclear morphometry and AgNOR quantification: computerized image analysis on ovarian mucinous tumor imprints. *Analyt Quant Cytol Hystol* 2008;30:160-8.
 114. Štemberger-Papić S, Stanković T, Vrdoljak-Mozetić D, Verša-Ostojić D, Krašević M, Štifter S et al. Morphome-

- try and digital AgNOR analysis in cytological imprints of benign, borderline and malignant serous ovarian tumors. *Cytopathol* 2006;17:382-9.
115. Vrdoljak-Mozetič D, Stanković T, Štemberger-Papić S, Verša-Ostojić D, Seili-Bekafigo I, Audy-Jurković S. Interaktivna morfometrijska analiza srebrom obojenih nukleolarnih organizacijskih regija (AgNOR-a) u diferencijalnoj citodijagnozi promjena endometrija. In: Audy-Jurković S (ed). *Ginekološka citologija u Hrvatskoj 50 godina poslije*. Zagreb: Hrvatski liječnički zbor, Hrvatsko društvo za kliničku citologiju, 2003;201-11.
 116. Seili-Bekafigo I. Primjena novih citoloških tehnika u dijagnozi i prognozi akutnih limfatičnih leukemija u odraslih. Zagreb: 2001. Magistarski rad.
 117. Seiwerth S, Čorić M, Bumber Z, Aralica G, Konjevoda P, Danic D et al. Potential prognostic significance of AgNOR and DNA content in laryngeal cancer. *Electron J Pathol Histol* 2001;7:71-81.
 118. Eminović-Behrem S, Trobonjaca Z, Petroveckí M, Dobi-Babić R, Dujmović M, Jonjić N. Prognostic significance of DNA ploidy pattern and nucleolar organizer regions (AgNOR) in colorectal carcinoma. *Croatian medical journal* 2000;41:154-8.
 119. Krstulja M, Đorđević G. Proliferation in the lining and stromal cells of synovia in inflammatory disease with tissue remodelling. In: *Cellular proliferation in cancer. Fifth Int Workshop on Applications of AgNORs in Pathology, Immunohistochemistry and Image Processing*. 1997, September 19-21, Zaragoza, Spain. *Anal Cell Pathol* 1998; 16:116.
 120. Jakić-Razumović J, Petroveckí M, Dominis M. AgNORs predictive value of prognosis in non-Hodgkin's lymphoma according to the Kiel classification. *Mod Pathol* 1995;8:143-9.
 121. Böckling A, Sproll C, Stöcklein N, Naujoks C, Depprich R, Kubler NR. Role of brush biopsy and DNA cytometry for prevention, diagnosis, therapy, and followup care of oral cancer. *J Oncol* 2011;2011:875959.
 122. Hariharan N, Sussman MA. Stressing on the nucleolus in cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842:798-801.
 123. Lavezzi AM, Alfonsi G, Pusiol T, Matturri L. Decreased argyrophilic nucleolar organiser region (AgNOR) expression in Purkinje cells: first signal of neuronal damage in sudden fetal and infant death. *J Clin Pathol* 2016;69: 58-63.
 124. Brooks WH, Yves Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmune diseases: the X chromosome-nucleolus nexus. *Front Genet* 2015;6:22.
 125. Pederson T. Ribosomal protein mutations in Diamond-Blackfan anemia: might they operate upstream from protein synthesis? *The FASEB J* 2007;21:3442-5.
 126. Mazouzi A, Velimezi G, Loizou JI. DNA replication stress: causes, resolution and disease. *Exp Cell Res* 2014;329: 1:85-93.
 127. Hetman M. Role of nucleolus in human disease. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:757.
 128. Alazami AM, Schneider SA, Bonneau D, Pasquier L, Carrecchio M, Kojovic M et al. C2orf37 mutational spectrum in Woodhouse-Sakati syndrome patients. *Clin Genet* 2010;78:585-90.
 129. De Keersmaecker K, Sulima SO, Dinman JD. Ribosomopathies and the paradox of cellular hypo- to hyperproliferation. *Blood* 2015;125:1377-82.
 130. Yu B, Mitchell GA, Richter A. Nucleolar localization of cirhin, the protein mutated in North American Indian childhood cirrhosis. *Exp Cell Res* 2005;311:218-28.
 131. Ochs RL, Lischwe MA, Spohn WH, Busch H. Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol Cell* 1985;54:123-33.
 132. Volarevic S, Stewart MJ, Lederman B, Zilberman F, Terracciano L, Montini E et al. Proliferation but not growth blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* 2000;288:2045-7.
 133. Gomes C, Smith SC, Youssef MN, Zheng JJ, Hagg T, Hetman M. RNA polymerase 1-driven transcription as a mediator of BDNF-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem* 2011;286:4357-63.
 134. Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, Wiemann S, Mason PJ et al. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet* 1998;19:32-8.
 135. Drygin D, Siddiqui-Jain A, O'Brien S, Schwaebé M, Lin A, Bliesath J et al. Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res* 2009;69:7653-61.
 136. Negi SS, Brown P. rRNA synthesis inhibitor, CX-5461, activates ATM/ATR pathway in acute lymphoblastic leukemia, arrests cells in G2 phase and induces apoptosis. *Oncotarget* 2015;6:18094-104.
 137. Burchett KM, Yan Y, Ouellette MM. Telomerase inhibitor Imetelstat (GRN163L) limits the lifespan of human pancreatic cancer cells. *PLoS One* 2014;9:e85155.
 138. Peltonen K, Colis L, Liu H, Jäämaa S, Zhang Z, Af Hällström T et al. Small molecule BMH-compounds that inhibit RNA polymerase I and cause nucleolar stress. *Mol Cancer Ther* 2014;13:2537-46.
 139. Yang L, Song T, Chen L, Soliman H, Chen J. Nucleolar repression facilitates initiation and maintenance of senescence. *Cell Cycle* 2015;14:3613-23.
 140. Brachet J. Gametogenesis. The nucleus of the oocyte. In: *The Biochemistry of Development*. Gauthier-Villars (ed). Paris: Pergamon Press, 1960;15-29.